

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659774

研究課題名（和文）

中枢のホスファターゼ阻害による妊娠糖尿病および仔の代謝異常の治療法の開発

研究課題名（英文）

Development of a new therapeutics of gestational diabetes by inhibition of the central action of lipid phosphatase

研究代表者

笹岡 利安 (SASAKA TOSHIYASU)

富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学）・教授

研究者番号：00272906

研究成果の概要（和文）：生活習慣の欧米化や晩婚化に伴い妊娠糖尿病は増加しており、適正な対策が必要となる。本研究により、妊娠の維持に重要なエストロゲンの中枢作用が、マウスでのインスリン作用と糖代謝の調節に重要なことが明らかとなった。また、リピッドホスファターゼ SHIP2 は、視床下部でのインスリン作用を特異的に制御することで、摂食と肥満に関わる。そこで、ligand-based drug design の手法により新規 SHIP2 阻害化合物をデザインし、合成して得られた候補化合物の中から、効果的にインスリン抵抗性病態での糖代謝を改善する新規 SHIP2 阻害化合物を見出し、今後の治療応用の可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Gestational diabetes increases with the life style changes including high-fat feeding and late marriage, and appropriate treatment against the diabetes is required. Present study demonstrated that a central action of estrogen, which is important for maintenance of the pregnancy, plays crucial roles in the control of insulin action and glucose homeostasis in mice. In addition, a lipid phosphatase SHIP2 in hypothalamus affected feeding behavior and body weight by specifically controlling the insulin action. Thus, we developed new candidate compounds for SHIP2 inhibitors by means of ligand-based drug design. We found that new SHIP2 inhibitors improved insulin resistance and glucose metabolism in diabetic mice. These results indicate that inhibition of SHIP2 appears to be beneficial for the treatment of gestational diabetes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：妊娠糖尿病、インスリン抵抗性、エストロゲン、リピッドホスファターゼ

## 1. 研究開始当初の背景

妊娠糖尿病の発症メカニズムをエストロゲンやプロゲステロンなどの性ホルモンの影響に着目して検討した。高濃度のエストロゲンは JNK 活性化を介して(Endocrinology 147:1020, 2006)、またプロゲステロンはインスリンシグナルを多岐のステップで阻害

し(Am J Physiol Endocrinol Metab 298:E881, 2010)、インスリン抵抗性を惹起することを解明し、その分子機構を報告した。近年、インスリンの中枢作用が糖代謝に重要であること、食欲の調節に重要なレプチンが視床下部でエストロゲンシグナルとクロストークすることが明らかとなり、視床下部におけるこれらの作用機構が注目されている。一

方、これらのホルモン作用の負の制御にはホスファターゼが重要な役割を担っている。我々は、その中の一つとしてインスリンシグナルを制御するリピッドホスファターゼ SHIP2 を同定し、病態での意義を解明してきた(Mol Cell Biol 21:1633, 2001, Diabetes 54:1958, 2005, Endocrinology 149:642, 2008)。中枢でのホスファターゼの阻害はインスリン抵抗性や肥満の防止に有効であると推測される。また経鼻投与などによる中枢選択的な阻害剤投与モデルの確立により、妊娠下での薬剤使用が胎児に与える影響を回避できると考えられる。以上より、中枢選択的にホスファターゼ活性を阻害することにより、妊娠糖尿病の発症予防を目指した新たな治療戦略の確立が期待できる。

## 2. 研究の目的

生活習慣の欧米化や晩婚化に伴い、妊娠糖尿病の増加が問題とされている。妊娠中に認められるインスリン抵抗性は本来胎児に適切に栄養を供給するための機構であるが、インスリン抵抗性が過度に増大すると母体は妊娠糖尿病を発症する。妊娠中の代謝異常は周産期・新生児合併症の増加だけでなく将来母体や児の2型糖尿病の発症にも影響することから、適切な対策が求められる。全身のインスリン感受性は視床下部により統合制御されており、末梢組織からのインプットとして重要なレプチンやインスリンの作用は、視床下部に発現するホスファターゼにより調節されている。このため、ホスファターゼ活性を適切に制御することで妊娠中の食欲とインスリン抵抗性を改善し得ると考えられる。そこで、エストロゲンのエネルギー代謝調節作用における、視床下部を介した中枢作用の寄与を明らかにする。さらに、糖尿病病態でのマウス母体に対し、ホスファターゼの活性を制御することで、母体の血圧、エネルギー代謝および耐糖能に及ぼす影響を検討する。本研究により、妊娠糖尿病の発症や、児の将来の発育や耐糖能の異常を防止する新たな対策の基盤を確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) エストロゲン(E2)の中枢作用の検討

C57BL/6 マウスを 1) 通常食群、2) 卵巣摘出(OVX)高脂肪食(HFD)負荷群、3) OVX HFD E2皮下投与(SC)群、4) OVX HFD E2脳室内投与(ICV)群に分類し、6週間HFD負荷後、浸透圧ポンプにてE2を皮下(50 µg/kg/day)または脳室内(1 µg/kg/day)に10日間持続投与して検討した。

### (2) 5' -リピッドホスファターゼ SHIP2 が中枢作用を介してエネルギー代謝に与える影響の検討

C57BL/6J マウスを用いて、視床下部のニューロンおよびグリア細胞における SHIP2 発現を免疫組織化学的方法により検討した。糖尿病病態での視床下部 SHIP2 の発現変化を、db/db マウスの視床下部 SHIP2 mRNA 発現量を測定することで評価した。また SHIP2 発現増加が糖代謝に及ぼす影響を検討するために、SHIP2 全身過剰発現マウス (SHIP2-Tg) での視床下部インスリン・レプチンシグナルおよびエネルギー代謝表現型の変化を検討した。

### (3) 新規 SHIP2 阻害化合物の開発と糖代謝改善効果の検討

新規 SHIP2 阻害剤を創出するために、既知の SHIP2 阻害剤を利用して *in silico* ligand-based drug design の手法によりデザインした。合成して得られた化合物を、培養 3T3-L1 脂肪細胞で Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) により誘導された Akt のリン酸化低下の改善を指標にスクリーニングを行い、有望な新規化合物の血糖降下作用と作用機序を db/db マウスを用いて解析した。

## 4. 研究成果

### (1) エストロゲンの中枢作用

OVX HFD 群は体重の増加、空腹時血糖値および血清インスリン値の上昇を認めたが、E2 の SC、ICV 投与はこれらをほぼ同等に改善した。さらに糖負荷およびインスリン負荷試験で認められた OVX HFD 群の耐糖能低下とインスリン抵抗性は、E2 SC、ICV 群において同等の改善を認めた。MRI による脂肪体積の検討、性腺周囲脂肪の組織学的検討により、OVX HFD 群では著明な内臓脂肪および皮下脂肪体積と脂肪細胞サイズの増大を認めた。E2 投与はこれらを縮小させたが、その効果は E2 ICV 群と比べ E2 SC 群でより著明であった。これらに一致して OVX HFD 群で認められた白色脂肪組織 (WAT) における脂質合成遺伝子 Lipo-protein lipase (LPL), Fatty acid synthase (FAS) および慢性炎症の指標である Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) の発現は E2 SC 群のみで有意に抑制された。一方、肝臓の糖新生律速酵素は E2 SC 群、E2 ICV 群の両群で同等に抑制され、OVX HFD 群で低下した酸素消費量、エネルギー消費量も E2 投与両群で改善した。さらに WAT の脂肪分解酵素 Hormone sensitive lipase (HSL)、自発運動量、深部体温、褐色脂肪組織での UCP1 発現は E2 ICV 群のみで上昇を認めた。

以上本研究により、エストロゲンは、末梢作用により直接 WAT に作用することで脂肪合成を抑制し、WAT の慢性炎症を抑制した。ま

た、中枢作用によりエネルギー消費を亢進し、肝糖新生を抑制し、WAT の脂肪分解を促進することで、体脂肪量を減少し糖代謝の維持に寄与することが示された。

(2) リピッドホスファターゼ SHIP2 が中枢作用を介してエネルギー代謝に与える影響  
視床下部弓状核に発現する摂食亢進性神経ペプチド Neuropeptide Y (NPY) と摂食抑制性神経ペプチド Proopiomelanocortin (POMC) の発現ニューロンにおいて SHIP2 発現を見出した。興味深いことに、db/db マウスの視床下部における SHIP2 mRNA 発現量は、対照マウスに比べて増加していた。そこで SHIP2-Tg を用いて、SHIP2 発現増加が視床下部のインスリンおよびレプチンシグナルに与える影響を検討した。インスリン脳室内投与による視床下部の PI (3, 4, 5)P3 量と Akt のリン酸化は、いずれも SHIP2-Tg において低下していた。これらの結果と一致して、SHIP2-Tg ではインスリン脳室内投与による摂食抑制効果は減弱していたが、レプチン脳室内投与による摂食抑制効果には影響を認めなかった。さらに SHIP2-Tg は WT に比べて絶食後の再摂食量は増加していた。視床下部における摂食関連神経ペプチドの mRNA 発現量に関しては、絶食下の SHIP2-Tg において、摂食亢進性神経ペプチドの NPY および Agouti related protein (AgRP) 発現に変化を認めなかったが、摂食抑制性神経ペプチドの POMC 発現の低下を認めた。SHIP2-Tg は、個体のエネルギー消費量である酸素消費量および自発運動量には有意な変化を示さなかったが、SHIP2-Tg は内臓脂肪蓄積に伴う体重増加を示した。

以上本研究により、糖尿病状態で視床下部にて発現が増加する SHIP2 は、視床下部ニューロンに発現しインスリンシグナルを負に制御することにより、再摂食量の増加、体脂肪量の増加に関連することが明らかとなった。

(3) 新規 SHIP2 阻害化合物の開発と糖代謝改善効果

新規 SHIP2 阻害剤を創出する目的で、既知の SHIP2 阻害剤を利用して *in silico* ligand-based drug design の手法により新規化合物をデザインし、合成して得られた 28 種の候補化合物の SHIP2 阻害活性をインスリンシグナルの改善効果により検討した。作製された 28 種の化合物の中で、12 種の化合物は Akt のリン酸化を改善した。特に N-[4-(4-chlorobenzoyloxy)pyridin-2-yl]-2-(2,6-difluorophenyl)-acetamide (CPDA) は最も強い Akt リン酸化の改善効果を呈した。本改善効果は、既存の SHIP2 阻害剤である AS1949490 より優れていたことから、CPDA の

糖代謝改善作用を db/db マウスを用いて検討した。CPDA および AS1949490 を 10 日間経口投与して代謝表現型を検討したところ、CPDA および AS1949490 は、体重増加に影響を与えずに効果的に空腹時血糖値を低下させた。CPDA および AS1949490 による血糖低下の機序として、肝臓の糖新生律速酵素である PEPCK の mRNA 発現量の低下を認めた。さらに糖負荷試験において、AS1949490 投与群は対照群に比べ血糖値の低下傾向を示し、CPDA 投与群では有意な血糖値の低下を認めた。

以上より、エストロゲンは中枢性及び末梢組織で協調的に糖エネルギー代謝を制御していることが明らかとなった。現在、エストロゲン依存性腫瘍のリスクから、エストロゲンは肥満・糖尿病治療目的で使用できない。本研究成果を基に、末梢で作用しない中枢選択的な投与が可能となれば、エストロゲンによる新たなホルモン補充療法が開発できる可能性が示唆された。また、リピッドホスファターゼ SHIP2 は、末梢での作用に加えて、視床下部のインスリンシグナルを特異的に減弱させることで、摂食量と体重の調節に寄与することが示唆された。SHIP2 は、糖尿病病態に伴い増加することから、インスリン抵抗性を誘発し、内臓脂肪の増加に伴う肥満や 2 型糖尿病の原因となる可能性が示唆された。本研究により創出された新規 SHIP2 阻害剤は db/db マウスの糖代謝を改善することから、肥満を引き起こさずに効果的な血糖降下作用を発揮する新規糖尿病治療薬の開発に繋がる可能性が期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Ichihara Y, Fujimura R, Tsuneki H, Wada T, Okamoto K, Gouda H, Hirono S, Sugimoto K, Matsuya Y, Sasaoka T, Toyooka N. Rational design and synthesis of 4-substituted 2-pyridin-2-ylamides with inhibitory effects on SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase 2 (SHIP2). *Eur J Med Chem.* 62: 649-660, 2013. 査読有.
2. Ichihara Y, Wada T, Soeda Y, Ishii Y, Sasahara M, Tsuneki H, Sasaoka T. SH2-containing inositol 5'-phosphatase 2 selectively impairs hypothalamic insulin signalling and regulation of food intake in mice. *J Neuroendocrinol.* 25: 372-382, 2013. 査読有.
3. Yonezawa R, Wada T, Matsumoto N, Morita M, Sawakawa K, Ishii Y, Sasahara

M, Tsuneki H, Saito S, Sasaoka T. Central versus peripheral impact of estradiol on the impaired glucose metabolism in ovariectomized mice on a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 303: E445-E456, 2012. 査読有.

[学会発表] (計16件)

1. 恒枝宏史, 和田 努, 笹岡利安. 糖尿病に伴う脳機能障害におけるインスリン作用の役割. 第86回日本薬理学会年会, 2013年3月21-23日, 博多.
2. 岡本健太郎, 恒枝宏史, 添田義行, 市原克則, 和田 努, 笹岡利安. 脳インスリン抵抗性に伴う脳高次機能障害に対するリピッドホスファターゼSHIP2阻害剤の改善効果の解析. 日本薬学会北陸支部第124回例会, 2012年11月18日, 金沢.
3. 市原克則, 和田 努, 岡本健太郎, 藤村遼平, 豊岡尚樹, 合田浩明, 広野修一, 恒枝宏史, 笹岡利安. 5'-リピッドホスファターゼSHIP2が摂食行動に与える影響の解析と, SHIP2を標的とした新規耐糖能改善薬の開発. 日本薬学会北陸支部第124回例会, 2012年11月18日, 金沢.
4. 澤川香苗, 和田 努, 森田真裕子, 米澤理可, 齋藤 滋, 恒枝宏史, 笹岡利安. 閉経肥満モデルマウスにおけるエストロゲンの中枢及び末梢投与が不安とうつに与える影響の検討. 第12回日本内分泌学会北陸支部学術集会, 2012年11月10日, 金沢.
5. 米澤理可, 和田 努, 笹岡利安, 鮫島梓, 齋藤 滋. エストロゲンの末梢または中枢投与が閉経肥満モデルマウスのうつ症状改善に与える影響. 第60回北日本産科婦人科学会総会・学術講演会, 2012年9月8-9日, 山形.
6. Yonezawa R, Wada T, Morita M, Sawakawa K, Ishii Y, Sasahara M, Tsuneki H, Sasaoka T, Saito S. Central and peripheral estrogen differentially ameliorates impaired glucose metabolism in postmenopausal obese mice model. *American Diabetes Association (ADA) 72th Scientific Sessions*, 2012年6月8-12日, Philadelphia, PA, U.S.A.
7. 米澤理可, 和田 努, 森田真裕子, 澤川香苗, 松本奈都美, 恒枝宏史, 笹岡利安, 齋藤 滋. エストロゲンの糖脂質代謝改善作用における中枢及び末梢作用の機能的差異の検討. 第55回日本糖尿病学会年次学術集会, 2012年5月17-19日, 横浜.
8. 岡本健太郎, 恒枝宏史, 細尾脩史, 市原克則, 和田 努, 笹岡利安. 糖尿病病態におけるリピッドホスファターゼSHIP2の増加が脳高次機能に関わるBDNF発現に与える影響. 第55回日本糖尿病学会年次学術集会, 2012年5月17-19日, 横浜.
9. 市原克則, 和田 努, 岡本健太郎, 藤村遼平, 豊岡尚樹, 合田浩明, 広野修一, 恒枝宏史, 笹岡利安. 新規骨格を有する5'-リピッドホスファターゼSHIP2阻害薬の開発とインスリン抵抗性改善効果の検討. 第55回日本糖尿病学会年次学術集会, 2012年5月17-19日, 横浜.
10. 米澤理可, 和田 努, 笹岡利安, 齋藤 滋. エストロゲンの末梢または中枢投与による, 卵巣摘出後高脂肪食負荷マウスの糖脂質代謝とうつ症状に対する改善効果とメカニズムの解析. 日本産科婦人科学会第64回学術講演会, 2012年4月13日-15日, 神戸.
11. 和田 努. エストロゲン・プロゲステロンによるインスリン抵抗性. 日本産科婦人科学会第64回学術講演会, 2012年4月13-15日, 神戸.
12. Sasaoka T, Yonezawa R, Morita M, Sawakawa K, Tsuneki H, Saito S, Wada T. Estrogen ameliorates glucose homeostasis by coordinating central and peripheral hormonal actions in a postmenopausal obese model of mice. *40th Keystone Symposia, Pathogenesis of Diabetes: Emerging Insights into Molecular Mechanisms*, 2012年1月29日-2月3日, Santa Fe, NM, U.S.A.
13. 米澤理可, 和田 努, 笹岡利安, 齋藤 滋. エストロゲンによる中枢性及び末梢性の糖エネルギー代謝改善作用の比較検討. 第27回日本糖尿病・妊娠学会年次学術集会, 2011年11月11-12日, 神戸.
14. 森田真裕子, 和田 努, 米澤理可, 松本奈都美, 澤川香苗, 齋藤 滋, 恒枝宏史, 笹岡利安. エストロゲンの中枢性および末梢性代謝調節作用の検討. 第11回日本内分泌学会北陸支部学術集会, 2011年11月5日, 富山.
15. 米澤理可, 和田 努, 笹岡利安, 齋藤 滋. エストロゲンの中枢及び末梢投与が全身のエネルギーバランス, 体脂肪分布と糖・脂質代謝に与える影響. 第63回日本産科婦人科学会学術講演会, 2011年8月29-31日, 大阪.
16. 市原克則, 和田 努, 添田義行, 石井陽子, 笹原正清, 恒枝宏史, 笹岡利安. リピッドホスファターゼSHIP2が中枢性エネルギー代謝に与える影響. 第12回Pharmaco-Hematology Symposium, 2011年6月17日, 富山.

[図書] (計1件)

1. 笹岡利安, 恒枝宏史, 和田 努. 妊娠によるインスリン抵抗性発症機序. 内分泌・糖尿

病・代謝内科, 科学評論社, 32 卷:211-219  
頁, 2011 年.

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称: 新規なN- (ピリジン-2-イル) アルカンアミド誘導体およびそれらを有効成分とするSHIP2阻害剤

発明者: 笹岡利安, 恒枝宏史, 和田 努, 豊岡尚樹, 広野修一

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許、WO 2012169571 A1

取得年月日: 平成24年12月13日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/clinphar/index-j.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

笹岡 利安 (SASAOKA TOSHIYASU)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学) ・  
教授

研究者番号: 00272906

### (2) 研究分担者

恒枝 宏史 (TSUNEKI HIROSHI)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学) ・  
准教授

研究者番号: 20332661

和田 努 (WADA TSUTOMU)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学) ・  
助教

研究者番号: 00419334